

## 明 細 書

## マイクロ流路利用反応方法

## 5 技術分野

本発明は、流体に担持された化合物分子に対するマイクロ流路特有の作用を利用して、種々の化学反応を効率よく行わせる新規なマイクロ流路利用反応方法に関する。

## 10 背景技術

われわれが日常的に接している生活用品やそれを構成する素材のほとんどは、化学的に合成されたものである。

そして、これらの物品や素材の製造工業においては、化学反応を効率よく行うことは、単に原料のコスト削減のみでなく、使用するエネルギーや生産に伴う産業廃棄物の減少という点でも非常に好ましい。

これまで、これらの物品や素材の製造は、ほとんどが大容量の反応容器を用いてバッチ方式で反応させるか、又は大きな管の中を流通させながら連続的に反応させる方法がとられていた。

しかしながら、これらの製造方法は大量生産には適しているが、所望に  
20 応じ多種類のものを少量ずつ製造する多目的少量生産方式には不適当であったし、またある種の製品については、このような製造方法を用いることができないという欠点があった。

他方、最近に至り、マイクロ流路を用いて種々の反応を行わせる方法が開発され、例えば、極細の管状の流路では壁面との接触比表面積が大きいことから、これを利用して、壁面に酵素を固定化し、高効率で酵素  
25 反応を行わせる方法 [「ケミストリー・レターズ (Chem. Letters)」, 2001年, 第442~443ページ]、複数の溶液を同時に供給して層流を形成させ、溶液間の界面で反応させることにより、ナノサイズレベルの均一

な粒子を製造する方法（「日刊工業新聞」，平成14年3月20日号記事）などが提案されている。

#### 発明の開示

- 5      本発明は、マイクロ流路が流体に担持された分子に対して示す特有の作用を利用して化学反応を効率よく行わせることを目的としてなされたものである。

本発明者らは、マイクロ流路を用いた化学方法について種々研究を行い、マイクロ流路の特有の作用を利用すれば、これまでの方法では進行しにくかった化学反応が効率よく進行することを見出し、この知見に基づいて本発明をなすに至った。

- すなわち、本発明は、相互に反応する2種又はそれ以上の反応体を化学反応させるに当り、反応体分子を流体に担持させてマイクロ流路に供給し、マイクロ流路の分子構造、分子配向又は溶液中における分子の分布状態を変化させる作用を利用して化学反応を効率よく行わせることを特徴とするマイクロ流路利用反応方法を提供するものである。

- このように、本発明方法は、幅が数100 $\mu\text{m}$ 以下という極細の流路に、流体に分子を担持させて流した場合、その流れが層流を形成したり、あるいは壁面との接触比表面積が大きいため、流速勾配が大きくなるなどの流れ現象に起因する特有の作用を示し、例えば長い直鎖状の分子が凝縮して丸まった状態から伸長するなどの分子形状の変化を生じて、内側に隠れていた特定反応サイトへの反応を可能にしたり、分子配列を一定方向に配向させたり、また反応体分子が条件によって流路の中心部又は壁面付近に自然に集合してくることを利用して、化学反応を高効率で行う方法である。

#### 図面の簡単な説明

図1は、実施例1の結果を示す顕微鏡写真である。

図 2 は、実施例 2 の結果を示す棒グラフである。

図 3 は、実施例 3 の結果を示す共焦点レーザー走査型顕微鏡写真である。

## 5 発明を実施するための最良の形態

本発明方法で用いるマイクロ流路は、不活性材料基板上に設けられていることが必要である。この不活性材料とは、プローブ分子や検体分子や使用される溶媒及び生成する複合体に対し、反応性を示さない材料のことであり、例えばガラス、石英、又はシリカ、 $\text{Si/SiO}_2$ 、マグネシア、  
10 ジルコニア、アルミナ、アパタイト、窒化ケイ素、及びチタン、アルミニウム、イットリウム、タングステンのような金属の酸化物、炭化物、窒化物、ホウ化物、ケイ化物などのセラミックスを挙げることができる。

このほか基板としては、使用する反応体に対し不活性なものである限り特に制限はなく、金属、プラスチックなども用いることができる。こ  
15 のベースの形状としては、板状体が普通であるが、所望ならば弧状体、球体、粒体などのものを用いることができる。

これらの材料は、選択する手段、反応体の種類、溶媒に応じて適宜選択されるが、光学的手段で検出する場合は、少なくとも検出部位においては使用する光の波長に対し、十分な透明性を示すものを用いる必要が  
20 ある。

本発明におけるマイクロ流路としては、これらの不活性材料基板に、幅及び深さ  $1 \sim 1000 \mu\text{m}$ 、好ましくは  $50 \sim 400 \mu\text{m}$  のサイズで刻設されたものか、又は同程度の大きさのキャピラリーチューブが用いられる。このマイクロ流路の長さには特に制限はなく、使用される不活性  
25 材料のサイズに依存するが、通常  $100 \sim 1000 \text{ mm}$  の範囲で選ばれる。

このようなマイクロ流路は、市販のキャピラリーチューブをそのまま用いてもよいし、またマイクロドリルのような工作機械を用いる機械的

手段により基板上に刻設するか、あるいは半導体集積回路製造などに用いられる光リソグラフィー技術により溝を形成させた後、別の基板を接着することにより製造することができる。このような極細の流路を流れる流体は、たがいに可溶な溶媒であっても混ざり合うことなく、層流を形成したまま流れていく。また、このような極細の流路は、物質の拡散距離が短い、壁面との接触比表面積が大きく、流れの速度勾配が大きいなどの特徴を有している。

本発明方法において利用しうるマイクロ流路の、流体に担持された分子に対する特殊な作用としては、例えばそれぞれ別々に 2 種の反応体分子を担持させた流体を同時にマイクロ流路に流すと、両者が層流を形成し、その界面において化学反応が進行すること、溶液中で凝縮し、からまった状態にある長鎖状又は枝分かれ構造をもつ化合物分子をストレート状態に伸長させること、溶液中でランダム状態に分散している化合物分子の配向状態を変化させること、反応体分子を流路の中心部又は壁面付近に集合させることなどを挙げることができる。

本発明方法においては、マイクロ流路を流れる溶液の状態の上記特殊性によってもたらされる反応体分子の状態の変化により、化学反応の高性能化をはかったものである。例えば、DNA 分子やその他の長直鎖高分子は、溶液中では通常、凝縮状態、すなわち丸まった状態にあるが、マイクロ流路内を流れているときには、ほつれて直線状に伸びる。このような高分子の形状の変化により、隠れていた反応部位を溶液中に露出させることができ、従来法よりもはるかに大きい反応速度で反応を進行させたり、特定反応部位への反応の高選択性化を行うことができ、また、不可能であった化学反応や分子認識をもととしたセンシングデバイスへの応用を可能にすることができる。

また、タンパク質のような生体関連化合物は、ある特定の対象と高度な選択性をもって結合するが、その際、いわゆる「鍵と鍵穴」ではなく、対象にあわせてタンパク質などの立体的な形状も変化するというインジ

ユースド・フット (「induced fit」) の重要性が知られている。そして、マイクロ流路にこのような生体関連物質を流した場合、その流れ状態の特殊性によってもたらされる外的要因により、タンパク質が基質を認識するのに都合のよい立体構造へと変化する。

- 5      さらに、マイクロ流路を流れる反応体分子は、その流れ状態の特殊性によって、一定方向に向きが揃う配向状態となる。このような配向状態は、その反応体分子が完全な真球状をとらない限り必然的にもたらされる。例えば、2液の界面における反応の場合、この配向によって反応部位を界面方向に揃えることができ、化学反応を高効率に行うことが可能
- 10      となる。

本発明方法において、マイクロ流路に溶液を送液するには、例えば注射器を接続し、シリンジポンプ等の機械的手段により送液速度、送液圧力などを調節しながら行うことにより、反応体分子の構造状態や配向状態を制御することができる。

- 15      本発明方法において、マイクロ流路に反応体分子を供給するには、2種類以上の反応体をあらかじめ混合し、これを担持させた流体を供給してもよいし、2種又はそれ以上の反応体分子を担持させた流体を同時に供給してもよいし、また1種又はそれ以上の反応体分子をマイクロ流路壁面に固定化しておき、それと異なる反応体分子を流体に担持させて供
- 20      給してもよい。

本発明は、化学反応一般に適用可能であるが、少量多品種・高純度が高度に要求される医薬・生体関連物質の合成や分析・分離に対して特に有用である。

- 次に、本発明を実施例によりさらに詳細に説明するが、本発明はこれ
- 25      らの例により、何ら限定されるものではない。

#### 実施例 1

蛍光性色素 D A P I (4',6-diamino-2-phenylindole) で染色し

たDNA (T4GT7 DNA) 溶液を、内径500 $\mu$ mのガラス製キャピラリーに送液し、内部を流れるDNAの形状を蛍光顕微鏡で観察した。この溶液としては、10 $\mu$ mol/l DNA (塩基対換算)、50 $\mu$ mol/l DAPI、4% (体積比) 2-メルカプトエタノールを含む水溶液を用いる。キャピラリーチューブを下から観察し、内壁下端から10 $\mu$ mの高さの位置に顕微鏡の焦点を合わせ、DNAの形状を撮影した。図1 (a) ないし (g) は異なった流速におけるDNAの形状を示す写真である。これらの図において、(a) は流れの停止時、(b)、(c)、(d)、(e)、(f) 及び (g) は、それぞれ送液速度は、2, 5, 10, 20, 50 及び 100  $\mu$ l/minのものである。

これらの図において、白く写っているものがDNAである。この一連の図から分るように、キャピラリーチューブ内において、流れを止めているときから徐々に流速を上げていくと、凝縮状態であったDNAが直鎖状に伸びていく状態と、それが流れ方向に配向されている状態が観察される。

この結果から、マイクロ流路を流れる溶液の流れ状態の特殊性によって、分子の構造の変化がもたらされること、さらにはその分子は、一方方向に配向することが分った。

## 20 実施例 2

L-乳酸デヒドロゲナーゼにより、ピルビン酸をL-乳酸へ還元する反応を、バッチ式反応器とマイクロ流路を用いて行い、性能を比較した。すなわち、33 $\mu$ mol/l ピルビン酸、2 $\mu$ mol/l L-乳酸デヒドロゲナーゼ、pH 7.4 リン酸緩衝液の条件で4分間反応を行い、反応前のL-乳酸デヒドロゲナーゼの最大吸収波長340 nmにおける吸光度の減少から収率を求めた。

図2は、上記酵素反応を、バッチ式反応器とマイクロ流路で行った場合の収率を比較したものである。マイクロ流路を用いた場合における収

率は、バッチ式のそれと比べ大幅な収率の改善が認められた。

この結果から、マイクロ流路を利用した化学反応は、従来法の主流であるバッチ式に比べ、大幅な性能の向上を実現できることが分った。

### 5 実施例 3

50  $\mu\text{mol/l}$  フルオレセインを含む水溶液と純水とを、マイクロ流路に層流を形成させながら流し、その状態を共焦点レーザー走査型顕微鏡で観察した。

図3は、共焦点レーザー走査型顕微鏡により流路断面を観察したものである。フルオレセインを含む水溶液と含まない純水が互いに混ざり合うことなく層流を形成して流れているが、その両者の接する付近に、周囲よりも特に明るく写っている部分がある。つまりここにはより多くのフルオレセインが存在しているということであり、マイクロ流路を流れる溶液の流れの特殊性によって、流路中央部付近に、溶質分子が局在化される現象が確認された。

### 産業上の利用可能性

本発明によると、マイクロ流路を流れる溶液の流れ状態の特殊性が反応体分子の構造や配向などの状態の変化をもたらし、それによって化学反応を高効率で行うことができる。それはただ単に反応速度や収率の向上にとどまらず、反応部位が高次構造の中に隠れているという理由などで、従来法のバッチ式ではほとんど進行しなかった化学反応を進行可能にする。しかも、本発明方法によると、物質や化合物の合成だけでなく、特定物質の分析や分離などを行うこともできる。

## 請 求 の 範 囲

1. 相互に反応する2種又はそれ以上の反応体を化学反応させるに当り、反応体分子を流体に担持させてマイクロ流路に供給し、マイクロ流路の分子構造、分子配向又は溶液中における分子の分布状態を変化させる作用を利用して化学反応を効率よく行わせることを特徴とするマイクロ流路利用反応方法。  
5
2. 2種類以上の反応体をあらかじめ混合し、担持させた流体を供給しながら行う請求の範囲第1項記載のマイクロ流路利用反応方法。  
10
3. それぞれ別々に2種又はそれ以上の反応体分子を担持させた流体を同時にマイクロ流路に流し、両者を層流として形成し、その界面において化学反応を行わせる請求の範囲第1項又は第2項記載のマイクロ流路利用反応方法。  
15
4. 1種又はそれ以上の反応体分子を担持させた流体をマイクロ流路に流し、流路壁面に固定化された別の反応体分子と化学反応を行わせる請求の範囲第1項ないし第3項のいずれかに記載のマイクロ流路利用反応方法。  
20
5. 溶液中で凝縮し、からまった状態にある長鎖状又は枝分かれ構造をもつ化合物分子をストレート状態に伸長させるマイクロ流路の作用を利用して行う請求の範囲第1項ないし第4項のいずれかに記載のマイクロ流路利用反応方法。  
25
6. 溶液中でランダム状態に分散している化合物分子を、配向状態に変化させるマイクロ流路の作用を利用して行う請求の範囲第1項ないし

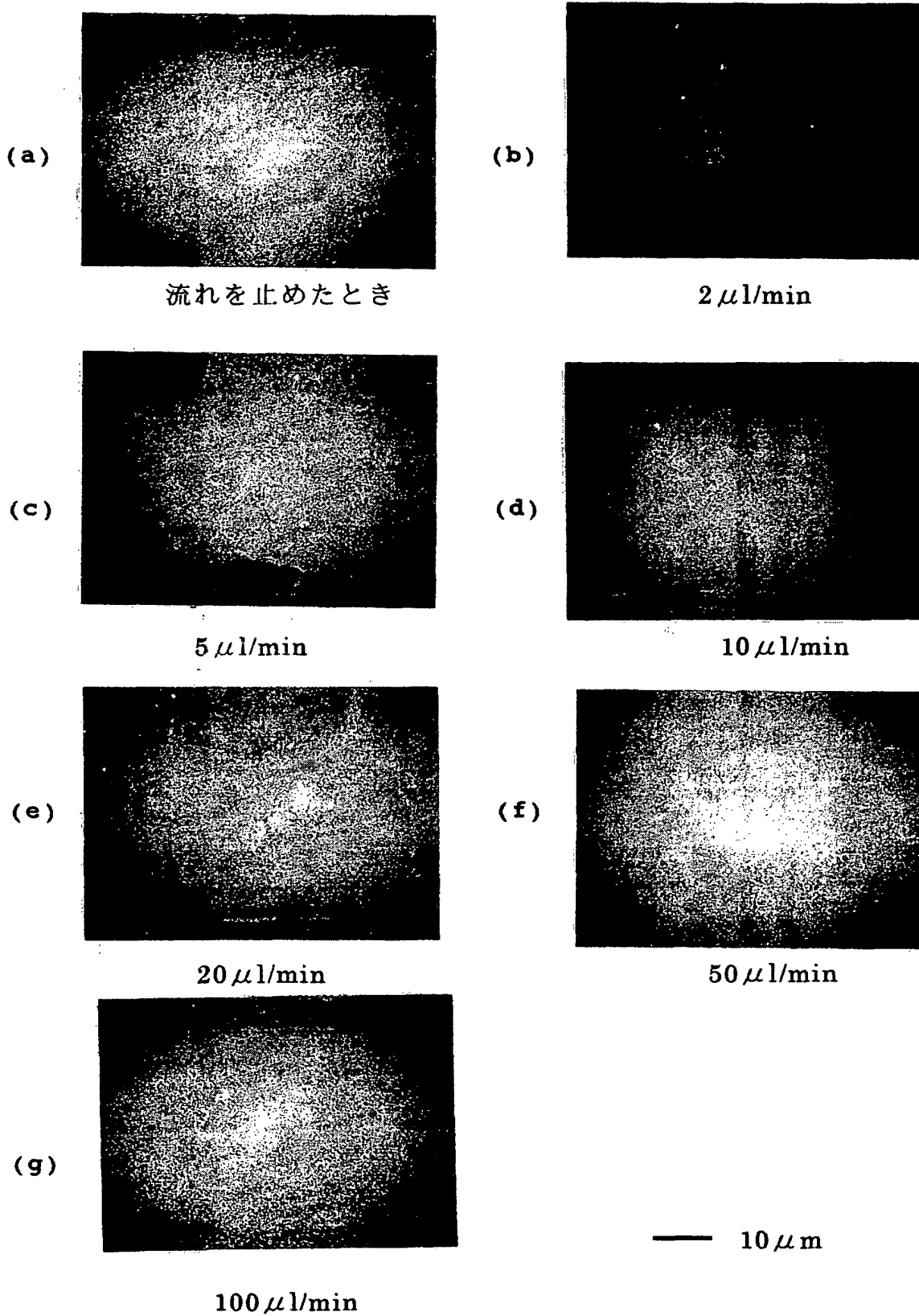


第 4 項のいずれかに記載のマイクロ流路利用反応方法。

7. 溶液がマイクロ流路を通過する際、溶液中に均一に分布していた反応体分子が、流路の中心部又は壁面付近に集合してくるマイクロ流路
- 5 の作用を利用して行う請求の範囲第 1 項ないし第 4 項のいずれかに記載のマイクロ流路利用反応方法。

1 / 2

図 1



2 / 2

図 2

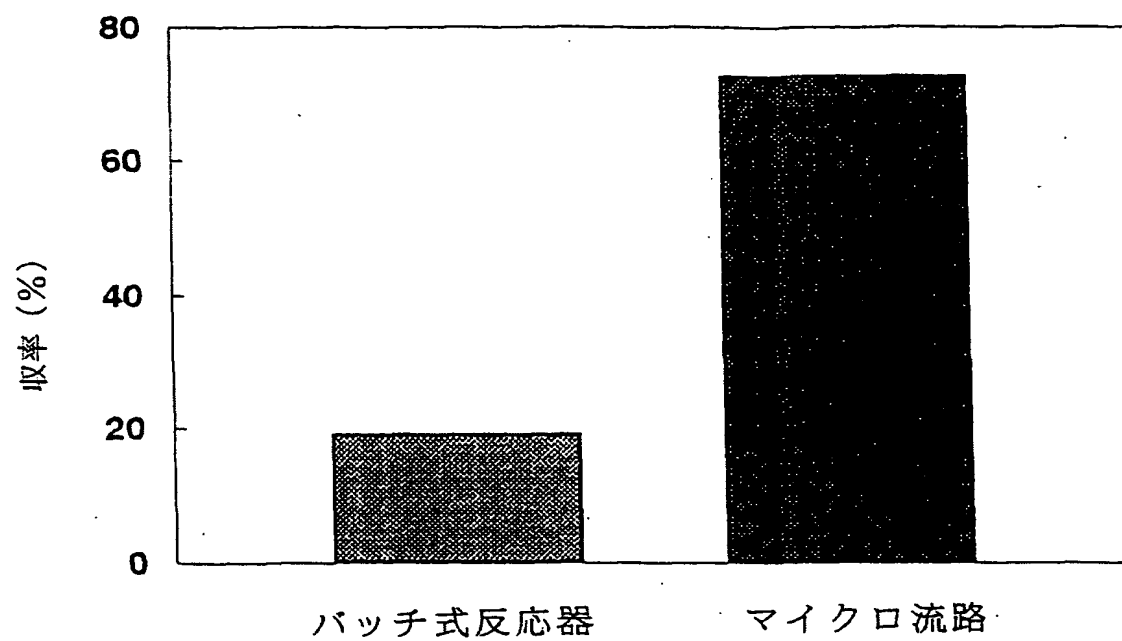
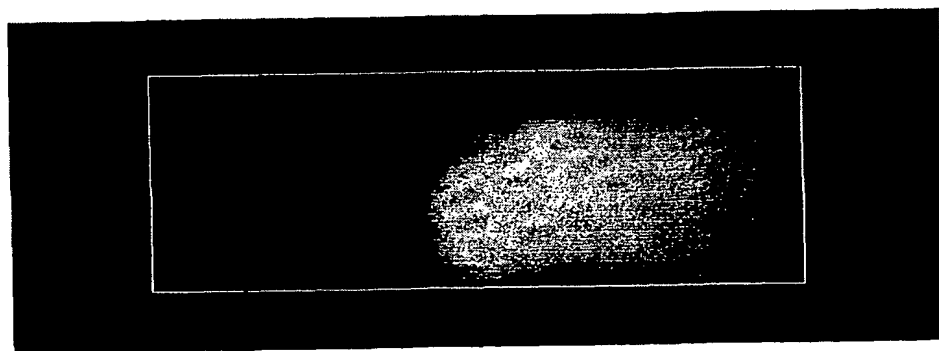


図 3



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/JP03/12172A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
Int.Cl.<sup>7</sup> B01J19/00, B81B1/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
Int.Cl.<sup>7</sup> B01J19/00, B81B1/00Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched  
Jitsuyo Shinan Koho 1926-1996 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2003  
Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2003 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2003Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
WPI

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, A	JP 2002-361002 A (Minolta Co., Ltd.), 17 December, 2002 (17.12.02), Claims; page 3, Par. No. [0011] to page 7, Par. No. [0076] (Family: none)	1-7
E, X	JP 2003-299946 A (Casio Computer Co., Ltd.), 21 October, 2003 (21.10.03), Claims; page 3, Par. No. [0001]; page 7, Par. No. [0034] to page 8, Par. No. [0041] (Family: none)	4
A	US 6200814 B1 (BIACORE AB.), 13 March, 2001 (13.03.01), Full text & JP 2002-509248 A & WO 99/36766 A1 & EP 1021703 A	1-7

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.
 ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search  
17 December, 2003 (17.12.03)Date of mailing of the international search report  
13 January, 2004 (13.01.04)Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/JP03/12172

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2000-246092 A (Zaidan Hojin Kawamura Rikagaku Kenkyusho), 12 September, 2000 (12.09.00), Claims; page 3, Par. No. [0010] to page 4, Par. No. [0013] (Family: none)	1-7

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> B01J19/00, B81B1/00

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> B01J19/00, B81B1/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1926-1996
日本国公開実用新案公報	1971-2003
日本国登録実用新案公報	1994-2003
日本国実用新案登録公報	1996-2003

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

WPI

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
PA	JP 2002-361002 A (ミノルタ株式会社), 2002. 12. 17, 特許請求の範囲, 第3頁段落【0011】 -第7頁段落【0076】, (ファミリーなし)	1-7
EX	JP 2003-299946 A (カシオ計算機株式会社), 2003. 10. 21, 特許請求の範囲, 第3頁段落【0001】 第7頁段落【0034】-第8頁段落【0041】, (ファミリーなし)	4

☒ C欄の続きにも文献が列举されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献  
「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

17. 12. 03

国際調査報告の発送日

13.01.04

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)  
郵便番号100-8915  
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

新居田 知生

4Q

8618

電話番号 03-3581-1101 内線 3466

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	US 6 200 814 B1 (BIACORE AB) , 2001. 03. 13 全文 & JP 2002-509248 A & WO 99/36766 A1 & EP 1021703 A	1-7
A	JP 2000-246092 A (財団法人 川村理化学研究所) 2000. 09. 12, 特許請求の範囲, 第3頁段落【0010】 -第4頁段落【0013】, (ファミリーなし)	1-7